



AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST**
(bioMerieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860/2860)

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEX
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**
(bioMerieux Best.Nr. 39000 / Hologic Kat.Nr. 102860/2860)

**TEST D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE
M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE**
(bioMerieux ref. 39000 / Hologic Cat.No. 102860/2860)

**TEST PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**
(bioMerieux ref. 39000 / Hologic Cat.No. 102860/2860)

**TEST DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI
DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA CULTURA**
(bioMerieux cod. 39000 / Hologic Cat. N. 102860/2860)

**TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO
M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA**
(bioMerieux ref. 39000 / Hologic Cat.No. 102860/2860)

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST

FOR EXPORT USE ONLY

(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860/2860)

INTENDED USE

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST is a rapid DNA probe test which utilizes the technique of nucleic acid hybridization for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* (TB Complex) isolated from culture. The TB Complex consists of the following species: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, and *M. canetti* (8, 11).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Organisms of the TB Complex are responsible for significant morbidity and mortality in humans. *M. tuberculosis* is the most common TB Complex pathogen isolated from humans. 21,244 new cases of tuberculosis were reported in 1988 (2). *M. bovis BCG* may be transmitted from infected animals to humans (6). *M. africanum* causes pulmonary tuberculosis in tropical Africa (9) and *M. microti* primarily infects animals.

Tuberculosis is highly contagious, therefore rapid diagnosis of the disease is important. For most clinical laboratories assignment of an isolate to the TB Complex is sufficient because the probability that an isolate is a species other than *M. tuberculosis* is extremely small (5, 6, 10). A number of biochemical tests are recommended to speciate members of the TB Complex if further differentiation is required.

Classical methods for identification of mycobacteria rely on staining specimens for acid fast bacilli followed by culture and biochemical testing. It could take as long as two months to speciate an isolate using these standard methods. (3).

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST identifies TB Complex isolated from culture in less than an hour.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (4). The AccuProbe System uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label that is complementary to the ribosomal RNA of the target organism. After the ribosomal RNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's ribosomal RNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in a Hologic luminometer. A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

REAGENTS

Note: For information on any hazard and precautionary statements that may be associated with reagents, refer to the Safety Data Sheet Library at www.hologic.com/sds.

Reagents for the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX PROBE KIT

Component	Quantity
Probe Reagent (P) <i>Mycobacterium tuberculosis complex.</i>	(4 x 5 tubes)
Lysing Tubes (LT) <i>Glass beads and buffer.</i>	(1 x 20 tubes)

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

Component	Quantity
Reagent 1 (Lysis Reagent) (1) <i>Buffered solution containing 0.04% sodium azide.</i>	1 x 10 mL
Reagent 2 (Hybridization Buffer) (2) <i>Buffered solution.</i>	1 x 10 mL
Reagent 3 (Selection Reagent) (3) <i>Buffered solution.</i>	1 x 60 mL

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT

Component	Quantity
Detection Reagent I (RI) <i>0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid</i>	1 x 240 mL
Detection Reagent II (RII) <i>1 N sodium hydroxide</i>	1 x 240 mL

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- A. For *in vitro* diagnostic use.
- B. Use universal precautions when performing this assay (1).
- C. Use only for the identification of TB Complex isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.
- E. Culture handling and all procedural steps through the heat inactivation step should be performed in a Class II Biological Safety Cabinet.

- F. Reagents in this kit contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal of these reagents, always dilute the material with a large volume of water to prevent azide buildup in the plumbing.
- G. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes. **WARNING: CORROSIVE PRODUCT.** Wash with water if contact with these reagents occurs. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.

STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS

Probe Reagent Tubes must be stored in the foil pouches at 2° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed and the tubes should be used within two months and prior to the expiration date.

Other reagents used in the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° to 25°C and are stable until the expiration date indicated.

DO NOT FREEZE THE REAGENTS.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of TB Complex isolated from culture.

- A. **Solid Media Method.** Growth from appropriate solid media, such as Lowenstein-Jensen slants or Middlebrook 7H10 or 7H11 plates, suggestive of TB Complex may be tested. Samples may be tested as soon as growth is visible and during the subsequent sixty days of incubation.
 1. Growth can be removed with a 1 µL disposable plastic loop, a wire loop, or a disposable plastic needle. Swabs should not be used due to the small volume of liquid in which the cells are subsequently resuspended.
 2. Avoid taking any of the solid media with the cells.
 3. The operator may elect to inoculate another culture plate at this time to confirm the purity of the isolate.
- B. **Broth Culture Method.** Growth in Middlebrook 7H9 broth with turbidity equivalent to or greater than a McFarland 1 Nephelometer Standard may be tested with the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. Pipette a 100 µL sample from the well mixed broth suspension into the Lysing Reagent Tube as described below.

MATERIALS PROVIDED

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST
(bioMérieux ref. 39000 / HologicHologic Cat. No. 102860/2860)

Component	20 Tests
Probe Reagent (P)	4 x 5 tubes
Lysing Tubes (LT)	1 x 20 tubes

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1 µL plastic sterile inoculating loops, wire loops, or plastic needles for selecting colonies.
Control culture strains
Water bath or dry heat bath* (59.5° to 61°C)
Water bath or dry heat bath* (95° ± 5°C)
Micropipettes (100 µL, 300 µL)
Re-pipettor (100 µL, 300 µL)
Vortex mixer
McFarland 1 Nephelometer Standard

*Heating blocks in the dry heat bath should have wells that are correctly sized for 12 x 75 mm tubes. The use of Hologic dry heat baths is recommended

AVAILABLE FROM YOUR HOLOGIC DISTRIBUTOR

	Cat. No.
Hologic Leader 50i Luminometer (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i/3100i
Hologic Sonicator (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104/T460
AccuProbe Culture Identification Reagent Kit (<i>bioMérieux ref. 39305</i>)	102800/2800
Hologic Detection Reagent Kit (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791/1791
Dry Heat Bath (59.5° to 61°C) (<i>bioMérieux ref. 39406</i>)	3397
Dry Heat Bath (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39407</i>)	3398
Dry Heat Bath (59.5°- 61°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39408</i>)	3399
Hologic Sonicator Rack (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027/4027

TEST PROCEDURE

A. EQUIPMENT PREPARATION

1. For optimal transfer of sonic energy, water must be thoroughly degassed according to the following procedure:
 - a. Add enough water to fill the sonicator bath to within ½ inch of the top of the tank.
 - b. Run the sonicator for 15 minutes to thoroughly degas the water.
2. Adjust one heating block or water bath to 59.5° to 61°C and another heating block or water bath to 95° ± 5°C.

3. Prepare the Hologic luminometer for operation. Make sure there is sufficient volume of Detection Reagents I and II to complete the tests.

B. CONTROLS

Positive and negative control strains should be tested routinely in each laboratory according to local regulations. A culture of *Mycobacterium tuberculosis* (e.g. American Type Culture Collection, ATCC #25177) may be used as the positive control while a culture of *Mycobacterium avium* (e.g., ATCC #25291) may be used as the negative control.

C. SAMPLE PREPARATION

1. Label a sufficient number of Lysing Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.
2. Pipette 100 μ L of Reagent 1 (Lysis Reagent) and 100 μ L of Reagent 2 (Hybridization Buffer) into all Lysing Reagent Tubes. **If broth cultures are to be tested, do not add Reagent 1 to the Lysing Reagent Tubes.**
3. Transfer the sample from the solid media or 100 μ L of a well mixed broth culture into the labeled Lysing Reagent Tubes as described in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. Twirl the loop or needle in the Reagent 1 and Reagent 2 diluent mixture to remove the cells if testing growth from solid media.
4. Recap the Lysing Reagent Tubes and briefly Vortex.

D. SAMPLE LYSIS

1. Push the Lysing Reagent Tubes through the Sonicator Rack so that the reaction mixture in the bottom of the tube is submerged but the caps are above the water. Place Sonicator Rack on water bath sonicator. **DO NOT ALLOW THE TUBES TO TOUCH THE BOTTOM OR SIDES OF THE SONICATOR.**
2. Sonicate for 15 minutes.
3. Place the Lysing Reagent Tubes containing the sonicated organisms in a heating block or water bath for 10 minutes at $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
4. Carefully remove the Lysing Reagent Tubes from the heating block or water bath.

E. HYBRIDIZATION

1. Open the foil pouch by cutting evenly across the top of the pouch. Remove enough Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Reseal the pouch by folding the opened edge over several times and securing with adhesive tape or a clip. **Leave the desiccant pillow in the pouch.**
2. Label a sufficient number of Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.
3. Pipette 100 μ L of the lysed specimens from the Lysing Reagent Tubes into the corresponding Probe Reagent Tubes.
4. Recap the Probe Reagent Tubes and incubate for 15 minutes at 59.5° to 61°C (7) in a water bath or heating block.

F. SELECTION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Pipette 300 μ L of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Recap the tubes and Vortex them to mix completely.

2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 10 minutes at 59.5° to 61°C in a water bath or heating block.
3. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block and leave them at room temperature for at least 5 minutes. Remove and discard the caps. **Read the results in the luminometer within 1 hour.**

G. DETECTION

1. Select the appropriate protocol from the menu of the luminometer software.
2. Using a damp tissue or paper towel, wipe each tube to ensure that no residue is present on the outside of the tube and insert the tube into the luminometer according to the instrument directions.
3. When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

PROCEDURAL NOTES

- A. REAGENTS: Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate. Warming and mixing the solution at 35° to 60°C will dissolve the precipitate.
- B. TEMPERATURE: The Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the water bath or heat block is maintained within the specified temperature range.
- C. TIME: The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 10 minutes but no more than 11 minutes.
- D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the Lysing Reagent Tubes are submerged up to, but not above, the level of the sealing ring. It should also be ensured that the entire liquid reaction volume in the Probe Reaction Tubes is submerged.
- E. VORTEXING: It is critical to have a homogeneous mixture during the SAMPLE PREPARATION and SELECTION Steps, specifically after the addition of cells to Reagents 1 and 2 and after addition of Reagent 3.
- F. TROUBLE-SHOOTING
 1. Elevated negative control values (*Mycobacterium avium* ATCC #25291) greater than 10,000 RLU (Relative Light Units) in the Leader luminometer or 300 PLU (Photometric Light Units) in the AccuLDR (formerly PAL) luminometer can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.
 2. Low positive control values (*M. tuberculosis* ATCC #25177) less than 30,000 RLU in the Leader luminometer or 900 PLU in the AccuLDR (formerly PAL) luminometer can be caused by insufficient cell numbers, improper sonication, or by testing mixed or aged cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.

RESULTS

A. INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	AccuLDR (formerly PAL)	Leader
Cut-off value	900 PLU	30,000 RLU
Repeat range	600 – 899 PLU	20,000-29,999 RLU

B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative control (e.g., *M. avium*, ATCC #25291) and positive control (e.g., *M. tuberculosis*, ATCC #25177) should satisfy the following values:

	AccuLDR (formerly PAL)	Leader
Negative control	< 300 PLU	< 10,000 RLU
Positive control	> 900 PLU	> 30,000 RLU

LIMITATIONS

This method has been tested using fresh growth from solid media and from broth listed in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. The efficacy of this test has not been demonstrated on direct clinical specimens (e.g., urine, stool, or respiratory specimens).

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST does not differentiate between members of the TB Complex, i.e., *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, and *M. canetti*. The Probe Reagent does not react with any mycobacteria other than tubercle (MOTT) bacilli.

Results from the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

EXPECTED VALUES

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture biochemical identification methods at two sites using a total of 612 isolates of the TB Complex, 748 isolates of 28 other *Mycobacterium* species, and 7 other microbial isolates representing 1 genus. Standard culture identification is dependent on growth rate, colony morphology, microscopic examination, and a series of biochemical reactions. The isolates were categorized as either positive ($\geq 30,000$ RLU) or negative ($< 30,000$ RLU). The range of observations for negative cultures was 226 to 33,343 RLU and 4,163 to 646,053 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods is shown below.

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION						
AccuProbe Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Site 1	422	1	1	541	99.8%/99.1%	99.8%
Site 2	185	0	4	213	98.9%/100%	99.0%
Total	607	1	5	754	99.2%/99.9%	99.6%

When the discordant samples were retested, the correct results were obtained with the exception of one isolate from Site 2 which was nonviable.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. WITHIN-RUN PRECISION

The within-run precision of the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of ribosomal RNA isolated from *Mycobacterium tuberculosis* using 10 replicates in a single assay.

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	51,939	126,563
Standard Deviation	1,980	5,869
Coefficient of Variation	3.8%	4.6%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

The between-run precision was calculated by assaying the same two concentrations of *Mycobacterium tuberculosis* ribosomal RNA using single determinations in 12 consecutive runs.

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	51,522	126,227
Standard Deviation	1,952	4,575
Coefficient of Variation	3.8%	3.6%

C. SPECIFICITY

A total of 94 ATCC culture isolates were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 92 species from 40 genera. Six isolates of TB Complex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* and *M. tuberculosis*), 25 isolates of 25 other *Mycobacterium* species, and 63 isolates of 39 other genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. All TB Complex isolates tested produced a positive result using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. Other *Mycobacterium* species and the representative phylogenetic cross-section isolates did not react in this test.

D. RECOVERY

Mycobacterium tuberculosis ribosomal RNA at concentrations ranging from 5×10^{-4} μg to 1×10^{-1} μg per test was assayed in the presence of 30 million cells of either *M. avium*, *M. kansasii*, or *Nocardia asteroides*. There was no interference with *M. tuberculosis* signal observed and the other organisms present did not react using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best.Nr. 39000 / Hologic Kat.Nr. 102860/2860)

VERWENDUNGSZWECK

Der ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von *Mycobacterium tuberculosis* (TB Komplex) aus Kulturoislaten ermöglicht. Der TB-Komplex besteht aus folgenden Spezies: *M. Tuberculosis*, *M. Bovis*, *M. Bovis BCG*, *M. Africanum*, *M. Microti* und *M. Canetti* (8, 11).

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Mykobakterien des TB Komplexes tragen signifikant zur Morbidität und Mortalität des Menschen bei. *M. Tuberculosis* ist der beim Menschen am häufigsten isolierte Erreger. 1988 wurden alleine in den U.S.A. 21.244 neue Tuberkuloseinfektionen registriert (2). *M. Bovis BCG* kann von infizierten Tieren auf den Menschen übertragen werden (6). *M. Africanum* ruft eine Lungentuberkulose bei Bewohnern im tropischen Afrika hervor (9) und *M. Microti* infiziert hauptsächlich Tiere.

Da die Tuberkulose eine hochinfektiöse Erkrankung darstellt, ist eine schnelle Diagnose sehr wichtig. Für die meisten klinischen Labore ist die Zuordnung eines Erregers zum TB-Komplex ausreichend, da die Wahrscheinlichkeit, einen anderen Erreger als *M. Tuberculosis* zu finden, sehr gering ist (5, 6, 10). Wird eine weitergehende Differenzierung des Erregers benötigt, sind weitere biochemische Tests notwendig.

Die klassischen Methoden zur Identifizierung von Mykobakterien beruhen auf der Färbung von säurefesten Bakterien, gefolgt von Kulturansätzen und biochemischen Tests. Die Identifizierung kann unter diesen Umständen bis zu 2 Monate in Anspruch nehmen (3).

Der ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST identifiziert Mykobakterien des TB Komplexes von der Kultur innerhalb von 1 Stunde.

PRINZIP

Die Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (4). Der AccuProbe Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das Hologic luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIEN

Hinweis: Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.

Die Reagenzien des ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS SONDEN-TESTKIT

Sondenreagenz (P) <i>M. tuberculosis</i> Komplex.	(4 x 5 Röhrcchen)
---	-------------------

Lyseröhrchen (LT) Glaskügelchen und Puffer.	(1 x 20 Röhrcchen)
---	--------------------

ACCUPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENKIT

Reagenz 1 (Lysereagenz) (1) Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid.	1 x 10 ml
---	-----------

Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) (2) Pufferlösung.	1 x 10 ml
---	-----------

Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (3) Pufferlösung.	1 x 60 ml
---	-----------

HOLOGIC DETEKTIONS-REAGENZIENKIT

Detektionsreagenz I (RI) 0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N Salpetersäure.	1 x 240 ml
--	------------

Detektionsreagenz II (RII) 1N Natriumhydroxid.	1 x 240 ml
--	------------

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (1).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von Mykobakterien des TB-Komplexes aus der Kultur.
- D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- E. Die Bearbeitung der Kulturen und alle weiteren Schritte bis zur Hitzeinaktivierung sollten unter einer Laminar Flow Box erfolgen.
- F. Die Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren zu explosiven Metallaziden reagieren kann. Beim Ableiten in die Kanalisation sollten die Reagenzien immer mit reichlich Wasser verdünnt werden.

- G. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. **ACHTUNG: ÄTZENDE REAGENZIEN.** Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten eines dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

Die Sonden-Röhrchen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln lagern. Die original verpackten Sondenröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Beutels sind die Röhrchen 2 Monate, längstens jedoch bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Beutel sollten nach jedem Gebrauch wieder fest verschlossen werden.

Die übrigen Reagenzien des ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2°- 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG UND –VORBEREITUNG

Der ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *M. Tuberculosis* Komplex aus der Kultur.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Medien (z.B. Löwenstein Jensen oder Middlebrook 7H10 oder 7H11 Medien) angezchtet wurden und bei denen der Verdacht besteht, daß es sich um Bakterien des TB Komplexes handelt. Sie können die Kulturen testen, sobald Wachstum sichtbar wird oder während der folgenden 60-tägigen Inkubationszeit
1. Teile des Zellrasens mit einer 1µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Mykobakterien anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 2. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Kultur kein Nährboden mit abgenommen wird.
 3. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.
- B. **Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit Middlebrook 7H9 Bouillonkulturen durchgeführt werden, deren Trübung größer oder gleich McFarland 1 ist. Pipettieren Sie 100 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in ein Lyseröhrchen, wie im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG beschrieben.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTUR-BESTÄTIGUNGSTEST
bioMérieux Best.Nr. 39000 / Hologic Kat. Nr. 102860/2860

20 Tests	
Sondenreagenz (P)	4 x 5 Röhrchen
Lyseröhrchen (LT)	1 x 20 Röhrchen

ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Sterile 1ml Plastikösen, Metallösen oder Plastiknadeln zur Abnahme der Kolonien
Kontroll-Kulturstämme
Wasserbad oder Heizblock (59,5° bis 61°C)*
Wasserbad oder Heizblock (95° ± 5°C)*
Mikropipetten (100 µl, 300 µl)
Repetierpipetten (100 µl, 300 µl)
Vortex
McFarland 1 Standard

* Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhren geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme von Hologic zu verwenden.

ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN

	Cat. No.
Luminometer Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux Best.Nr. 39400</i>)	103100i/3100i
Hologic Ultraschallbad (<i>bioMérieux Best.Nr. 39409</i>)	901104/T460
ACCUPROBE REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG (<i>bioMérieux Best.Nr. 39305</i>)	102800/2800
HOLOGIC DETEKTIONS-REAGENZIENKIT (<i>bioMérieux Best.Nr. 39300</i>)	201791/1791
Heizblock (59,5° bis 61°C) (<i>bioMérieux Best.Nr. 39406</i>)	3397
Heizblock (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux Best.Nr. No. 39407</i>)	3398
Doppelheizblock (59,5°- 61°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux Best.Nr. 39408</i>)	3399
Hologic Röhrenständer für das Ultraschallbad (<i>bioMérieux Best.Nr. 39313</i>)	104027/4027

TEST DURCHFÜHRUNG

A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Für eine optimale Energieübertragung im Ultraschallbad muß das Wasser vor jedem Betrieb des Gerätes entgast werden:
 - a. Füllen Sie das Ultraschallbad bis ca. 1 cm unter den Rand mit Wasser.
 - b. Schalten Sie das Ultraschallbad für 15 min ein.
2. Einen Heizblock oder ein Wasserbad auf 59,5° bis 61°C und einen weiteren Heizblock oder ein Wasserbad auf 95° ± 5°C einstellen.

3. Bereiten Sie das Hologic Leader luminometer vor. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung des Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämme mitgeführt werden. Als positive Kontrolle kann eine *M. tuberculosis* Kultur dienen (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 25177), während als negative Kontrolle eine *M. avium* Kultur (ATCC 25291) verwendet werden kann.

C. PROBENVORBEREITUNG

1. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Lyseröhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
2. Pipettieren Sie 100 µl Reagenz 1 (Lysereagenz) und 100 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in alle Lyseröhrchen. **Geben Sie kein Reagenz 1 in die Lyseröhrchen, wenn Flüssigkulturen getestet werden.**
3. Überführen Sie die Probe vom festen Medium oder 100 µl eines gut gemischten Flüssigkulturmediums in die Lyseröhrchen, wie im Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG beschrieben. Bei Proben von festen Kulturmedien wirbeln Sie die Öse oder Nadel in der Reagenzmischung, so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden.
4. Lyseröhrchen gut verschließen und kurz vortexen.

D. LYSIEREN DER PROBEN

1. Die Lyseröhrchen in den Röhrchenständer des Ultraschallbads stellen, so daß das Probenmaterial am Boden der Röhrchen ins Wasser eintaucht, die Deckel jedoch über dem Wasser sind. **DIE RÖHRCHEN DÜRFEN DEN BODEN ODER DIE WÄNDE DES ULTRASCHALLBADS NICHT BERÜHREN.**
2. Schallen Sie die Probe für 15 min.
3. Anschließend werden die Lyseröhrchen mit den beschallten Mikroorganismen im Heizblock oder Wasserbad für 10 min bei $95^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$ erhitzt.
4. Die Lyseröhrchen vorsichtig aus dem Heizblock oder Wasserbad nehmen.

E. HYBRIDISIERUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Proben und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sondenröhrchen. Verschließen Sie den Beutel wieder, indem Sie ihn an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer luftdicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenröhrchen für die Kulturproben und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 100 µl der lysierten Proben aus den Lyseröhrchen in die entsprechenden Sondenröhrchen.
4. Verschließen Sie die Sondenröhrchen und inkubieren Sie diese für 15 min bei $59,5^{\circ}$ bis 61°C (7) im Wasserbad oder einem Heizblock.

F. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder dem Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen und vortexen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese um den Inhalt gleichmäßig zu durchmischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenröhrchen für 10 min bei 59,5° bis 61°C im Wasserbad oder einem Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder dem Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen. **Die Röhrchen innerhalb der nächsten Stunde im luminometer messen.**

G. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand, sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollten die Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen gemäß den Angaben im Handbuch in das luminometer.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem luminometer

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf 35° - 60°C erhitzen und mischen.
 - B. TEMPERATUR: Hybridisierung und Selektion sind temperatur-abhängige Reaktionen. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß der Heizblock und das Wasserbad im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.
 - C. REAKTIONSDAUER: Hybridisierung und Selektion sind zeit-abhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenröhrchen während des Selektionsschrittes mindestens 10 min, jedoch nicht länger als 11 min inkubieren.
 - D. WASSERBAD: Ein gleichbleibend hoher Wasserstand ist wichtig, so daß die Röhrchen mit dem Lysereagenz bis zum Dichtungsring ins Wasser reichen, jedoch nicht darüber hinaus. Achten Sie darauf, daß sich die gesamte Reaktionslösung der Lyseröhrchen im Wasser befindet.
 - E. VORTEXEN: Während der Arbeitsschritte PROBEN-VORBEREITUNG und SELEKTION muß besonders darauf geachtet werden, daß die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe der Mikroorganismen zu den Reagenzien 1 und 2 und nach Zugabe von Reagenz 3.
- ## F. FEHLERMÖGLICHKEITEN
1. Bei Messungen mit dem luminometer Leader können erhöhte negative Kontrollwerte (*M. avium* ATCC 25291) über 10.000 RLU (Relative Light Units) durch unzureichendes Mischen nach der Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem luminometer AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 300 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.

- Schwach positive Kontrollwerte (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), unter 30.000 RLU auf dem Luminometer Leader oder 900 PLU auf dem Luminometer AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Keimzahlen, falscher Beschallung oder durch Testen von Mischkulturen oder zu alten Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des ACCUPROBE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST M. TUBERCULOSIS KOMPLEX werden auf der Basis eines Grenzwertes interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale dem Grenzwert entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Lichtsignale unterhalb dieses Grenzwertes werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden.

	AccuLDR (vormals PAL)	Leader
Grenzwert	900 PLU	30.000 RLU
Graubereich	600 - 899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die negativen Kontrollen (z.B. *M. avium*, ATCC 25291) und die positiven Kontrollen (z.B. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) müssen folgenden Sollwerten entsprechen.

	AccuLDR (vormals PAL)	Leader
Negativkontrolle	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Positivkontrolle	> 900 PLU	> 30.000 RLU

LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die, wie im Abschnitt PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG beschrieben, auf festen Medien und in Flüssigkulturen angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben (z.B. Urin, Stuhl oder Proben aus dem Respirationstrakt) wurde nicht evaluiert.

Der Test ermöglicht keine Differenzierung von Subspezies des TB Komplexes (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, und *M. canetti*). Das Sondenreagenz reagiert nicht mit atypischen Mykobakterien (MOTT).

Die Ergebnisse des ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTUR-BESTÄTIGUNGSTEST wurde im Vergleich zu den klassischen Kulturverfahren mit biochemischer Identifizierung an zwei Orten getestet. 612 Stämme des TB Komplexes, 748 Stämme von 28 weiteren Mykobakterienarten, sowie 7 andere Proben, die einen Genus repräsentierten, wurden getestet. Die klassischen Identifizierungsmethoden basierten auf der Wachstumsrate, der Kolonienmorphologie, der mikroskopischen Untersuchung und einer Reihe biochemischer Reaktionen. Die Proben wurden als positiv (≥ 30.000 RLU) oder negativ (< 30.000 RLU)

bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 226 bis 33.343 RLU ermittelt, die Ergebnisse der positiven Kulturen lagen zwischen 4.163 und 646.053 RLU. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist in folgender Tabelle angegeben.

AccuProbe Kultur	AccuProbe / KULTUR				Sensitivität/ Spezifität	Übereinstimmung
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg		
Labor 1	422	1	1	541	99,8%/99,1%	99,8%
Labor 2	185	0	4	213	98,9%/100%	99,0%
Gesamt	607	1	5	754	99,2%/99,9%	99,6%

Proben mit diskrepanten Ergebnissen wurden nochmals getestet und ergaben anschließend die erwarteten Ergebnisse, bis auf einen Stamm des Labors 2, der nicht lebensfähig war.

TESTPERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS wurden zwei unterschiedliche Konzentration der rRNA von *M. tuberculosis* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert (RLU)	51.939	126.563
Standardabweichung	1.980	5.869
Variationskoeffizient	3,8%	4,6%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der rRNA von *M. tuberculosis* einmal in 12 verschiedenen Testserien bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert (RLU)	51.522	126.227
Standardabweichung	1.952	4.575
Variationskoeffizient	3,8%	3,6%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 94 ATCC Kulturstämme mit dem ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST untersucht. Diese Proben umfaßten insgesamt 92 Spezies aus 40 Gattungen. Sechs Proben aus dem TB-Komplex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. tuberculosis*), 25 Proben mit 25 anderen *Mycobacterium* Spezies und 63 Proben von 39 anderen Gattungen eines phylogenetisch repräsentativen Querschnitts wurden mit dem ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Alle untersuchten Stämme des TB-Komplexes reagierten positiv. Andere *Mycobacterium* Spezies, sowie die Proben des phylogenetischen Querschnitts reagierten in diesem Test nicht.

D. WIEDERFINDUNG

Es wurden *M. tuberculosis* rRNA Konzentrationen von 5×10^{-4} µg bis 1×10^{-1} µg pro Test in Anwesenheit von 30 Millionen Mikroorganismen getestet, die zu einer der folgenden Spezies gehörten: *M. avium*, *M. kansasii* oder *Nocardia asteroides*. Es wurden keine Interferenzen bzw. Kreuzreaktionen festgestellt mit dem ACCUPROBE M. TUBERCULOSIS KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST.

TEST D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39000 / Hologic Cat.No. 102860/2860)

UTILISATION

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE est un test d'identification rapide par sonde ADN des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (complexe TB) isolé à partir d'une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques. Le complexe TB se compose des espèces suivantes: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, et *M. canetti* (8, 11).

INTRODUCTION

Les microorganismes du complexe TB sont à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité significatives chez l'homme. *M. tuberculosis* est le germe pathogène du complexe TB le plus fréquemment isolé chez l'homme. En 1988, 21.244 nouveaux cas de tuberculose ont été rapportés aux USA (2). *M. bovis BCG* peut être transmis à l'homme à partir d'animaux infectés (6). *M. africanum* est responsable de tuberculose pulmonaire en Afrique tropicale (9), et *M. microti* infecte essentiellement les animaux.

La tuberculose est une maladie hautement contagieuse, par conséquent il est important d'en établir rapidement le diagnostic. Pour la plupart des laboratoires, l'identification du complexe TB, sans détermination de l'espèce concernée suffit, car la probabilité que la souche isolée appartienne à une espèce autre que *M. tuberculosis* est extrêmement faible (5, 6, 10). Un certain nombre de tests biochimiques peuvent permettre d'identifier ensuite les sous-espèces du complexe TB si une différenciation plus précise s'avère nécessaire.

Les méthodes classiques d'identification des mycobactéries reposent sur la recherche de bacilles acido-alcool-résistants par coloration de Ziehl-Nielsen, suivie par la mise en culture et l'analyse biochimique. Deux mois peuvent être nécessaires pour identifier une souche par ces méthodes (3).

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE identifie le complexe *M. tuberculosis* isolé à partir d'une culture en moins d'une heure.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables (4). La méthode AccuProbe utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des sondes non-hybridées. Le luminomètre Hologic permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybrides ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; il est négatif s'il indique une valeur inférieure.

RÉACTIFS

Remarque : Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.

Les réactifs utilisés pour le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts :

COFFRET SONDE POUR LE COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ACCUPROBE

Réactif Sonde (P) <i>Complexe M. tuberculosis</i>	(4 x 5 tubes)
---	---------------

Tube de Lyse (LT) <i>Billes de verre et tampon.</i>	(1 x 20 tubes)
---	----------------

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE ACCUPROBE

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) <i>Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium.</i>	1 x 10 ml
--	-----------

Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) (2) <i>Solution tamponnée.</i>	1 x 10 ml
---	-----------

Réactif 3 (Réactif de Sélection) (3) <i>Solution tamponnée.</i>	1 x 60 ml
---	-----------

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION HOLOGIC

Réactif de Détection I (RI) <i>0,1% d'eau oxygénée dans de l'acide nitrique 0,001 N.</i>	1 x 240 ml
--	------------

Réactif de Détection II (RII) <i>Hydroxide de sodium 1 N.</i>	1 x 240 ml
---	------------

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (1).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de mycobactéries du complexe TB isolées à partir d'une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. La manipulation des cultures et toutes les étapes du procédé jusqu' à l'étape d'inactivation par la chaleur doivent être effectuées dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe II.
- F. Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'évacuation de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.

- G. Eviter tout contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. **ATTENTION: PRODUIT CORROSIF.** En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION

Les tubes de Réactif Sonde doivent être conservés dans les sachets en aluminium à 2° - 8°C. Avant ouverture, ils sont stables jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes doivent être utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE peuvent être conservés entre 2° et 25°C, et restent stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES RÉACTIFS.

PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE est conçu pour identifier le complexe *M. tuberculosis* isolé à partir d'une culture.

- A. **Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, comme une gélose inclinée de Löwenstein-Jensen, ou des milieux de Middlebrook 7H10 ou 7H11, lorsqu'on observe une morphologie évocatrice du complexe TB. L'échantillon peut être testé dès que la prolifération est visible et pendant les soixante jours d'incubation suivants.
1. L'échantillon de culture peut être prélevé à l'aide d'une öse en plastique jetable de 1 µl, d'une öse métallique, ou d'une aiguille en plastique jetable. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison de la faible quantité de liquide dans lequel les mycobactéries vont être remises en suspension.
 2. Eviter de prélever du milieu de culture avec les mycobactéries.
 3. Le manipulateur peut à ce stade décider d'ensemencer un autre milieu de culture pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.
- B. **Identification sur bouillon de culture.** Le test peut être pratiqué sur des cultures en bouillon de Middlebrook 7H9 possédant une turbidité supérieure ou égale à 1 McFarland. Prélever à la pipette un échantillon de 100 µl de la suspension du bouillon parfaitement homogénéisé, et le distribuer dans le tube de Tube de Lyse en suivant les instructions du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

MATÉRIEL FOURNI

TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE

bioMérieux réf. 39000 / Hologic Cat. No. 102860/2860

	20 Tests
Réactif Sonde (P)	4 x 5 tubes
Tube de Lyse (LT)	1 x 20 tubes

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Öses de 1 µl en plastique stérile, öses métalliques, ou aiguilles en plastique pour prélever les colonies
Souches de contrôle des cultures
Bain-marie ou bloc chauffant (59,5° - 61°C)*
Bain-marie ou bloc chauffant (95° ± 5°C)*
Micropipettes (100 µl, 300 µl)
Pipettes répétitives (100 µl, 300 µl)
Vortex
Néphélomètre 1 McFarland

* Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 x 75 mm. L'utilisation des blocs chauffants Hologic est recommandée.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminomètre Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux réf. 39400</i>)	103100i/3100i
Bloc chauffant (59,5° - 61°C) (<i>bioMérieux réf. 39406</i>)	3397
Bloc chauffant (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux réf. 39407</i>)	3398
Bloc chauffant Twin (59,5° - 61°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux réf. 39408</i>)	3399
Sonicateur Hologic (<i>bioMérieux réf. 39409</i>)	901104/T460
Portoir de tubes pour le sonicateur Hologic (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027/4027
COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES ACCUPROBE (<i>bioMérieux réf. 39305</i>)	102800/2800)
COFFRET DE REACTIFS DE DÉTECTION HOLOGIC (<i>bioMérieux réf. 39300</i>)	201791/1791

MODE OPERATOIRE

A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

1. Remplir le réservoir du sonicateur d'eau jusqu'à environ 1 cm du bord.
2. L'eau du bain à ultrasons doit être parfaitement dégazée avant la manipulation afin d'optimiser le transfert d'énergie des ultrasons. Pour dégazer l'eau entièrement, faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.
3. Régler un bloc chauffant ou un bain-marie entre 59,5° et 61°C et un autre bloc chauffant ou bain-marie à 95° ± 5°C.

4. Préparer le luminomètre Hologic. S'assurer que la quantité de Réactifs de Détection I et II est suffisante pour pratiquer les tests.

B. CONTRÔLES

Des souches de contrôle positif et négatif doivent être testées en routine dans chaque laboratoire, selon la réglementation en vigueur. On peut utiliser une culture de *M. tuberculosis* (par ex. American Type Culture Collection, ATCC 25177) comme contrôle positif, et une culture de *M. avium* (ATCC 25291) comme contrôle négatif.

C. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

1. Identifier un nombre suffisant de Tubes de Lyse pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Ôter et conserver les bouchons.
2. Transférer à la pipette 100 µl de Réactif 1 (Réactif de Lyse) et 100 µl de Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) dans tous les Tubes de Lyse. **Si le test est effectué sur des souches isolées à partir de bouillon de culture, ne pas ajouter de Réactif 1 dans les Tubes de Lyse.**
3. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide ou 100 µl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les Tubes de Lyse, suivant les instructions données dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Si le test est réalisé sur une culture en milieu solide, agiter l'öse ou l'aiguille dans la solution pour remettre les cellules en suspension.
4. Reboucher les tubes de lyse et les agiter brièvement à l'aide d'un Vortex.

D. LYSE DE L'ÉCHANTILLON

1. Insérer les Tubes de Lyse dans le portoir du sonicateur de façon à ce que le mélange réactif au fond des tubes soit immergé, en maintenant les bouchons hors de l'eau. Mettre le portoir en place. **LES TUBES NE DOIVENT EN AUCUN CAS TOUCHER LE FOND OU LES PAROIS DU SONICATEUR.**
2. Faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.
3. Placer ensuite les tubes contenant les microorganismes lysés par sonication dans le bloc chauffant ou le bain-marie à 95° ± 5°C pendant 10 minutes.
4. Retirer avec précaution les Tubes de Lyse du bloc chauffant ou du bain-marie.

E. HYBRIDATION

1. Découper horizontalement la partie supérieure des sachets en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant à l'aide de ruban adhésif ou d'une pince. **Ne pas retirer le sachet dessicant.**
2. Identifier un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Ôter et conserver les bouchons.
3. Prélever 100 µl d'échantillon lysé des Tubes de Lyse et les distribuer dans les tubes de Réactif Sonde correspondants.
4. Reboucher les tubes de Réactif Sonde et les mettre à incuber pendant 15 minutes entre 59,5° et 61°C (7) dans le bain-marie ou le bloc chauffant.

F. SÉLECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Ôter et conserver les bouchons. Distribuer 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Reboucher les tubes et les agiter à l'aide d'un Vortex pour obtenir un mélange homogène.
2. Faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 10 minutes entre 59,5° et 61°C au bain-marie ou dans le bloc chauffant.
3. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Ôter et jeter les bouchons. Lire les résultats à l'aide du luminomètre dans l'heure qui suit.

G. DÉTECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.
2. Afin de retirer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le luminomètre et suivre les instructions.
3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du luminomètre.

REMARQUES

- A. RÉACTIFS: le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter. Le chauffer à 35° - 60°C et l'agiter pour dissoudre le précipité.
 - B. TEMPÉRATURE: l'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent, il est impératif de maintenir le bain-marie ou le bloc chauffant à la température préconisée.
 - C. DURÉE DES OPÉRATIONS : les réactions d'hybridation et de sélection sont dépendantes du temps. L'hybridation doit durer au moins 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes. Pendant l'étape de SÉLECTION, faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 10 minutes mais pas plus de 11 minutes.
 - D. BAIN-MARIE: le niveau d'eau doit être suffisamment élevé pour que les tubes de lyse soient immergés jusqu' à l'anneau de fermeture, mais pas au-dessus. S'assurer également que la totalité du liquide réactionnel des tubes de Réactif Sonde soit immergée.
 - E. UTILISATION DU VORTEX: il est essentiel de disposer d'un mélange homogène durant les étapes de PRÉPARATION de L'ÉCHANTILLON et de SÉLECTION, particulièrement après l'addition des microorganismes aux Réactifs 1 et 2, et après addition du Réactif 3.
- ## F. RESOLUTION D'INCIDENTS
1. Des valeurs élevées de contrôle négatif (*M. avium*, ATCC 25291), supérieures à 10.000 RLU (Relative Light Units) sur le Luminomètre Leader ou à 300 PLU (Photometric Light Units) sur le Luminomètre l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées soit lorsque l'homogénéisation a été insuffisante après l'addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit lorsque différents types de colonies sont présents. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.
 2. Des valeurs faibles de contrôle positif (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), inférieures à 30.000 RLU sur le Luminomètre Leader ou à 900 PLU sur le Luminomètre l' AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées lorsque le nombre de germes est insuffisant, lorsque la sonication n'est pas correctement effectuée, ou lorsque le test est réalisé sur des cultures mixtes ou âgées. Pour

vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.

RÉSULTATS

A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	AccuLDR (anciennement PAL)	Leader
Valeur limite	900 PLU	30.000 RLU
Zone d'incertitude	600 - 899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par ex. *M. avium*, ATCC 25291) et positifs (par ex. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	AccuLDR (anciennement PAL)	Leader
Contrôle négative	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Contrôle positif	> 900 PLU	> 30.000 RLU

LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur milieux solides et sur les types de bouillons de culture cités dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Les performances de ce test pratiqué directement sur des échantillons cliniques (urinaires, coprologiques ou respiratoires) n'ont pas été évaluées.

Le test ne permet pas de différencier les sous-espèces du complexe TB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, et *M. canetti*).

Les résultats du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE a été comparé aux méthodes classiques de culture avec identification biochimique sur deux sites. 612 souches du complexe TB, 748 souches de 28 autres espèces de mycobactéries et autres souches issues d'un genre différent ont été testées. Les méthodes classiques d'identification comprenaient l'étude du taux de croissance, l'étude de la morphologie des colonies, l'examen microscopique et une série de tests biochimiques. Le test AccuProbe a permis de classer les souches positives (≥ 30.000 RLU) et négatives (< 30.000 RLU). Les cultures négatives ont donné des résultats compris entre 226 et 33.343 RLU, les cultures positives des résultats se situant entre

4.163 et 646.053 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification figure ci-dessous.

AccuProbe / CULTURE						
AccuProbe Culture	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	422	1	1	541	99,8%/99,1%	99,8%
Site 2	185	0	4	213	98,9%/100%	99,0%
Total	607	1	5	754	99,2%/99,9%	99,6%

Les échantillons discordants ont été testés une nouvelle fois et ont alors donné les résultats attendus, à l'exception d'une souche du site 2 qui n'était pas viable.

PERFORMANCE DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE a été calculée en analysant deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *M. tuberculosis* 10 fois dans une même série.

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	51.939	126.563
Ecart-type	1.980	5.869
Coefficient de variation	3,8%	4,6%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *M. tuberculosis*, au cours de 12 séries distinctes.

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	51.522	126.227
Ecart-type	1.952	4.575
Coefficient de variation	3,8%	3,6%

C. SPÉCIFICITÉ

Un total de 94 souches de cultures ATCC a été étudié à l'aide du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE. Ces souches comprenaient 92 espèces issues de 40 genres différents. Un panel phylogénétique de 6 souches du complexe TB (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. tuberculosis*), 25 souches de 25 autres espèces de mycobactéries et 63 souches de 39 autres genres a été testé. Seules les souches du complexe TB ont donné un résultat positif avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE. Les autres espèces de mycobactéries et les autres microorganismes ont donné un résultat négatif.

D. TEST DE SURCHARGE

Des dilutions d'ARN ribosomal de *M. tuberculosis* dont les concentrations étaient comprises entre 5×10^{-4} µg et 1×10^{-1} µg par test ont été analysées en présence de 30 millions de microorganismes appartenant à l'une des espèces suivantes: *M. avium*, *M. kansasii* ou *Nocardia asteroides*. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. TUBERCULOSIS ISOLEES D'UNE CULTURE.

TEST PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat.No. 102860/2860)

UTILIZACION

El TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS es un test de identificación rápida mediante sonda DNA de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (complejo TB) aislado a partir de un cultivo. Este test utiliza la técnica de hibridación de los ácidos nucleicos. El complejo TB se compone de las siguientes especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti* (8, 11).

INTRODUCCION

Los microorganismos del complejo TB se encuentran en el origen de una morbilidad y mortalidad significativas en el hombre. *M. tuberculosis* es el germen patógeno del complejo TB más frecuentemente aislado en el hombre. En 1988 fueron registrados in USA 21.244 nuevos casos de tuberculosis (2). *M. bovis BCG* puede ser transmitida al hombre a partir de animales infectados (6). *M. africanum* es responsable de la tuberculosis pulmonar en Africa Tropical (9), y *M. microti* infecta esencialmente a los animales.

La tuberculosis es una enfermedad altamente contagiosa y, en consecuencia, es importante establecer un diagnóstico rápido. En la mayoría de los laboratorios la identificación del Complejo TB, sin determinar la especie concernida, resulta suficiente, por cuanto la probabilidad de que la cepa aislada pertenezca a una especie diferente a *M. tuberculosis* es extremadamente baja (5, 6, 10). Algunos tests bioquímicos pueden permitir identificar a continuación las subespecies del complejo TB, si resultara necesaria una diferenciación más precisa.

Los métodos clásicos de identificación de las micobacterias descansan en la detección de bacilos ácido-alcohol-resistentes mediante tinción de Ziehl-Nielsen, seguida de la puesta en cultivo y del análisis bioquímico. Pueden ser necesarios dos meses para identificar una cepa utilizando estos métodos (3).

El TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS identifica el complejo *M. tuberculosis* aislado a partir de un cultivo en menos de una hora.

PRINCIPIO

Los tests que utilizan hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos para aparearse de modo específico, formando complejos bicatenarios estables (4). El método AccuProbe utiliza una sonda de DNA monocatenario conjugado con un marcador quimioluminiscente complementario del RNA ribosómico (RNAr) del organismo diana. Cuando el RNAr del organismo diana es liberado, la sonda se hibrida con éste para formar un complejo DNA-RNA estable. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las sondas no hibridadas. El luminómetro Hologic permite medir la señal luminosa emitida por los híbridos DNA-RNA. El resultado es positivo si el luminómetro indica un valor superior o igual al valor umbral; es negativo si indica un valor inferior.

REACTIVOS

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

Los reactivos utilizados para el TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS se suministran en 3 kits diferentes :

KIT SONDA PARA EL COMPLEJO M. TUBERCULOSIS ACCUPROBE

Reactivo Sonda (P) <i>Complejo M. tuberculosis.</i>	(4 x 5 tubos)
---	---------------

Tubo de Lisis (LT) <i>Bolas de vidrio y tampón.</i>	(1 x 20 tubos)
---	----------------

KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVO ACCUPROBE

Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) (1) <i>Solución tampón que contiene 0,04% de azida sódica.</i>	1 x 10 ml
---	-----------

Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) (2) <i>Solución tampón.</i>	1 x 10 ml
--	-----------

Reactivo 3 (Reactivo de Selección) (3) <i>Solución tampón.</i>	1 x 60 ml
--	-----------

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION HOLOGIC

Reactivo de Detección I (RI) <i>0,1% de agua oxigenada en ácido nítrico 0,001 N.</i>	1 x 240 ml
--	------------

Reactivo de Detección II (RII) <i>Hidróxido de sodio 1 N.</i>	1 x 240 ml
---	------------

PRECAUCIONES DE UTILIZACION

- A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- B. Observar las precauciones habituales durante la realización de este test (1).
- C. Utilizar exclusivamente para la identificación de micobacterias del complejo TB aisladas a partir de un cultivo.
- D. Utilizar sólo el material suministrado o material desechable.
- E. La manipulación de los cultivos y todas las etapas del procedimiento hasta la etapa de inactivación térmica deben efectuarse en un recinto con seguridad microbiológica de clase II.
- F. Los reactivos de este kit contienen azida sódica, susceptible de reaccionar con el plomo o el cobre de las canalizaciones, formando azidas metálicas explosivas. Al desechar estos reactivos, enjuagar con agua abundante para evitar la formación de azidas en las tuberías.

- G. Evitar el contacto de los Agentes de Detección I y II con la piel, los ojos y las membranas mucosas. **ATENCIÓN: PRODUCTO CORROSIVO.** Lavar con agua si se produce cualquier contacto con esos reactivos. Si se producen salpicaduras de estos reactivos, diluir con agua antes de secar.

CONSERVACION

Los tubos del Reactivo Sonda deben conservarse en las bolsas de aluminio a 2° - 8°C. Antes de abrirlos, son estables hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura, la bolsa debe estar cerrada herméticamente y los tubos deben ser utilizados en un plazo de dos meses, dentro del límite de la fecha de caducidad.

Los otros reactivos del TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS pueden ser conservados entre 2° y 25°C, y permanecen estables hasta la fecha de caducidad.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA

El TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE UN CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ha sido diseñado para identificar el complejo *M. tuberculosis* aislado a partir de un cultivo.

- A. **Identificación a partir de cultivo en medio sólido.** El test puede ser practicado en cultivos realizados en un medio sólido apropiado, como Löwenstein-Jensen, o medios de Middlebrook 7H10 ó 7H11, cuando se observa una morfología que evoca el complejo TB. La muestra puede ser analizada desde el momento en que la proliferación es visible y durante los sesenta días de incubación siguientes.
1. La muestra de cultivo puede ser obtenida con ayuda de un asa de plástico desechable de 1 µl, de un asa metálica o de una aguja de plástico desechable. No utilizar escobillones dada la escasa cantidad de líquido en el cual las micobacterias serán puestas en suspensión.
 2. Evitar que la muestra incluya medio de cultivo junto con las micobacterias.
 3. El manipulador puede en esta etapa decidir sembrar en otro medio de cultivo para confirmar la pureza de la muestra aislada.
- B. **Identificación en caldo de cultivo.** El test puede realizarse a partir de cultivo en caldo de Middlebrook 7H9 que posea una opacidad superior o igual a 1 McFarland. Tomar con pipeta una muestra de 100 µL de la suspensión del caldo perfectamente homogeneizada y distribuirla en el tubo de lisis siguiendo las instrucciones del párrafo PREPARACION DE LA MUESTRA.

MATERIAL SUMINISTRADO

TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860/2860

20 Tests	
Reactivo Sonda (P)	4 x 5 tubos
Tubo de Lisis (LT)	1 x 20 tubos

MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Asas de 1 µl de plástico estéril, asas metálicas o agujas de plástico para tomar las muestras de colonias
Cepas de control de los cultivos
Baño maría o bloque calefactor (59,5° - 61°C)*
Baño maría o bloque calefactor (95° ± 5°C)*
Micropipetas (100 µl, 300 µl)
Pipetas de repetición (100 µl, 300 µl)
Vortex
Nefelómetro 1 McFarland

* Los emplazamientos dentro del bloque calefactor deben ser adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda el empleo de los bloques calefactores Hologic.

MATERIAL SUPLEMENTARIO DISPONIBLE EN EL LOCAL DE SU DISTRIBUIDOR HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminómetro Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i/3100i
Bloque calefactor (59,5° - 61°C) (<i>bioMérieux ref. 39406</i>)	3397
Bloque calefactor (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39407</i>)	3398
Bloque calefactor Twin (59,5° - 61°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39408</i>)	3399
Sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104/T460
Portatubos para el sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027/4027
KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVOS ACCUPROBE (<i>bioMérieux ref. 39305</i>)	102800/2800
KIT DE REACTIVOS DE DETECCION HOLOGIC (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791/1791

TECNICA

A. PREPARACION DEL MATERIAL

1. Llenar el depósito del sonicador con agua suficiente hasta aproximadamente 1 cm del borde.
2. El agua del baño de ultrasonidos debe ser cuidadosamente desgasificada antes de la manipulación con el fin de optimizar la transferencia de energía de los ultrasonidos. Para desgasificar a fondo el agua, hacer funcionar el sonicador durante 15 minutos.
3. Regular un bloque calefactor o un baño maría a 59,5° - 61°C y otro bloque calefactor o baño maría a 95° ± 5°C.

4. Preparar del luminómetro Hologic. Verificar que la cantidad de Reactivos de Detección I y II es suficiente para realizar los tests.

B. CONTROLES

Las cepas de control positivo y negativo deben ser analizadas rutinariamente en cada laboratorio, conforme a la reglamentación vigente. Se puede utilizar un cultivo de *M. tuberculosis* (321asti., American Type Culture Collection, ATCC 25177) como control positivo y un cultivo de *M. avium* (ATCC 25291) como control negativo.

C. PREPARACION DE LA MUESTRA

1. Identificar un número suficiente de tubos de lisis para analizar las muestras y/o las cepas de control. Retirar y conservar los tapones.
2. Transferir con pipeta 100 µl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) y 100 µl de Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los tubos de lisis. **Si el test se realiza en cepas aisladas a partir de caldo de cultivo, no añadir Reactivo 1 en los tubos de lisis.**
3. Transferir la muestra proveniente del medio sólido o 100 µl del caldo de cultivo correctamente homogeneizado en los tubos de lisis, siguiendo las instrucciones proporcionadas en el párrafo OBTENCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA. Si el test se realiza en un cultivo en medio sólido, agitar el asa en la solución para poner las células en suspensión.
4. Volver a tapar los tubos de lisis y agitarlos brevemente con ayuda de un Vortex.

D. LISIS DE LA MUESTRA

1. Insertar los tubos de lisis en el portatubos del sonicador, de manera que la muestra reactiva en el fondo de los tubos quede sumergida, manteniendo los tapones fuera del agua. Poner el portatubos en su lugar. LOS TUBOS NO DEBEN EN NINGUN CASO TOCAR EL FONDO O LAS PAREDES DEL SONICADOR.
2. Hacer funcionar el sonicador durante 15 minutos.
3. Colocar a continuación los tubos que contienen los microorganismos, tras la lisis por sonicación, en el bloque calefactor o en el baño maría a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.
4. Retirar cuidadosamente los tubos de lisis del bloque calefactor o del baño maría.

E. HIBRIDACION

1. Cortar horizontalmente la parte superior de las bolsas de aluminio. Retirar el número necesario de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o las cepas de control. Volver a cerrar la bolsa herméticamente, doblando varias veces su extremo y fijándola con cinta adhesiva o con una pinza. **No retirar la bolsa desecante.**
2. Identificar un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o las cepas de control. Retirar y conservar los tapones.
3. Después de la lisis tomar 100 µl de muestra de los tubos de lisis y distribuirlos en los tubos de Reactivo Sonda correspondientes.
4. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda y ponerlos a incubar durante 15 minutos a $59,5^{\circ} - 61^{\circ}\text{C}$ (7) en baño maría o en el bloque calefactor.

F. SELECCION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Distribuir 300 µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a tapar los tubos y agitarlos con un Vortex para obtener una mezcla homogénea.

2. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante 10 minutos a 59,5° - 61°C al baño maría o en el bloque calefactor.
3. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor y dejarlos a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos. Retirar y desechar los tapones. **Leer los resultados utilizando un luminómetro en la hora siguiente.**

G. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo adecuado en el luminómetro.
2. Con el fin de retirar cualquier residuo de la superficie de los tubos, enjuagarlos con papel absorbente húmedo. Colocar a continuación los tubos en el luminómetro y seguir las instrucciones.
3. Una vez terminado el análisis, retirar los tubos del luminómetro.

OBSERVACIONES

- A. REACTIVOS: el Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) pueda precipitar. Calentar a 35° - 60°C y agitarlo para disolver el precipitado.
- B. TEMPERATURA: la hibridación y la selección son reacciones termodependientes. En consecuencia, es imperativo mantener el baño maría o el bloque calefactor a la temperatura adecuada.
- C. DURACION DE LAS OPERACIONES: las reacciones de hibridación y de selección son dependientes del tiempo. La hibridación debe durar al menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Durante la etapa de SELECCION, incubar los tubos de Reactivo Sonda durante por lo menos 10 minutos, pero no más de 11 minutos.
- D. BAÑO MARÍA: el nivel de agua debe ser suficientemente alto para que los tubos de lisis queden sumergidos hasta el anillo de cierre, pero no por encima. Verificar igualmente que la totalidad del líquido reactivo de los tubos de Reactivo Sonda se encuentre sumergida.
- E. UTILIZACION DEL VORTEX: es esencial disponer de una mezcla homogénea durante las etapas de PREPARACION de LA MUESTRA y SELECCION, en particular después de añadir los microorganismos a los Reactivos 1 y 2, y después de la adición del Reactivo 3.
- F. RESOLUCION DE LOS INCIDENTES
 1. Valores elevados de control negativo (*M. avium*, ATCC 25291), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units) en el luminómetro Leader o a 300 PLU (Photometric Light Units) en el luminómetro AccuLDR (antiguo PAL) pueden observarse cuando la homogeneización ha sido insuficiente después de añadir el Reactivo 3 (Reactivo de Selección), o bien cuando diferentes tipos de colonias se encuentran presentes. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede sembrar una parte en un medio sólido apropiado e incubarla.
 2. Valores débiles de control positivo (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), inferiores a 30.000 RLU en el luminómetro Leader o a 900 PLU en el luminómetro AccuLDR (antiguo PAL) pueden observarse cuando el número de gérmenes es insuficiente, cuando la sonicación no ha sido correctamente realizada o cuando el test se aplica en cultivos mixtos o envejecidos. Para verificar que se trata de un cultivo mixto, se puede sembrar una parte en un medio sólido e incubarla.

RESULTADOS

A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS son interpretados en función de un valor umbral. Las muestras que producen una señal luminosa de valor superior o igual a este umbral, son consideradas positivas. Las señales luminosas inferiores a este umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se sitúa en una zona de incertidumbre, la prueba debe repetirse. Si un segundo análisis sigue dando resultados dudosos, debe sembrarse nuevamente la cepa con el fin de verificar su pureza.

	AccuLDR (antiguo PAL)	Leader
Valor límite	900 PLU	30.000 RLU
Zona de incertidumbre	600 – 899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Los controles negativos (p. ej., *M. avium*, ATCC 25291) y positivos (p. ej., *M. tuberculosis*, ATCC 25177) deben satisfacer los siguientes valores :

	AccuLDR (antiguo PAL)	Leader
Control negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Control positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

LIMITES DEL TEST

Este método ha sido analizado en cultivos frescos, realizados en medios sólidos, y en los tipos de caldos de cultivo citados en el párrafo OBTENCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA. No han sido evaluados los rendimientos de este test practicado directamente sobre muestras clínicas (urinarias, coprológicas o respiratorias).

El test no permite diferenciar las subespecies del complejo TB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canetti*).

Los resultados del TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICAR UN CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS deben ser interpretados en función de los otros datos del laboratorio y confrontados con los datos clínicos.

VALORES ESPERADOS

El TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICAR UN CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ha sido comparado con los métodos clásicos de cultivo con identificación bioquímica en dos sitios. Han sido analizadas 612 cepas del complejo TB, 748 cepas de otras 28 especies de micobacterias y otras 7 cepas provenientes de un género diferente. Los métodos clásicos de identificación incluyen el estudio de la tasa de crecimiento, de la morfología de las colonias, el examen microscópico y una serie de pruebas bioquímicas. El test AccuProbe ha permitido clasificar las cepas positivas (≥ 30.000 RLU) y negativas (< 30.000 RLU). Los cultivos negativos han dado resultados entre 226 y 33.343 RLU ; los cultivos positivos, resultados que se sitúan entre 4.163 y 646.053 RLU. La comparación de estos resultados con los métodos clásicos de identificación figuran a continuación.

AccuProbe / CULTIVO						
AccuProbe Cultivo	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/ Especificidad	Tasa de Concordancia
Sitio 1	422	1	1	541	99,8%/99,1%	99,8%
Sitio 2	185	0	4	213	98,9%/100%	99,0%
Total	607	1	5	754	99,2%/99,9%	99,6%

Las muestras discordantes han sido analizadas nuevamente y en ese momento dieron los resultados esperados, con excepción de una cepa del sitio 2 que no era viable.

RENDIMIENTOS DEL TEST

A. PRECISION INTRA-ENSAYO

La precisión intra-ensayo del TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ha sido calculada analizando concentraciones diferentes de RNA ribosómico de *M. tuberculosis* 10 veces en una misma serie.

Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	51.939	126.563
Desviación tipo	1.980	5.869
Coefficiente de variación	3,8%	4,6%

B. PRECISION INTER-ENSAYOS

La precisión inter-ensayos ha sido calculada analizando una sola vez dos concentraciones diferentes de RNA ribosómico de *M. tuberculosis*, durante 12 series diferentes.

Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	51.522	126.227
Desviación tipo	1.952	4.575
Coefficiente de variación	3,8%	3,6%

C. ESPECIFICIDAD

Un total de 94 cepas de cultivos ATCC fue estudiado con ayuda del TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. Estas cepas incluyen 92 especies provenientes de 40 géneros diferentes. Fue estudiado un conjunto filogenético de 6 cepas del complejo TB (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. tuberculosis*), 25 cepas de otras 25 especies de micobacterias y 63 cepas de otros 39 géneros. Únicamente las cepas del complejo TB dieron un resultado positivo con el TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. Las otras especies de micobacterias y los otros microorganismos dieron resultado negativo.

D. TEST DE SOBRECARGA

Fueron analizadas diluciones de RNA ribosómico de *M. tuberculosis* con concentraciones entre $5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ y $1 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ por test en presencia de 30 millones de microorganismos pertenecientes a una de las siguientes especies : *M. avium*, *M. kansasii* o *Nocardia asteroides*. No se observó ninguna interferencia ni reacción cruzada con el TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION A PARTIR DE CULTIVO DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM.

TEST DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA

(bioMérieux cod. 39000 / Hologic Cat. N. 102860/2860)

MODALITÀ D'IMPIEGO

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA è un test per la rapida identificazione - mediante sonda a DNA - dei micobatteri del gruppo *M. tuberculosis* complex (TB complex) isolati a partire da una coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici. Il TB complex comprende le seguenti specie: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, e *M. canetti* (8, 11).

INTRODUZIONE

I microrganismi del gruppo TB complex sono all'origine di un tasso significativamente alto di morbilità e di mortalità nell'uomo. *M. tuberculosis* è il germe patogeno del TB complex isolato con maggiore frequenza nell'uomo. Nel 1988 sono stati registrati 21.244 nuovi casi di tubercolosi negli USA (2). *M. bovis BCG* è l'agente etiologico della tubercolosi dei bovini e può infettare l'uomo (6). *M. africanum* sembra responsabile della tubercolosi polmonare in vaste aree dell'Africa tropicale (9) mentre *M. microti* infetta prevalentemente gli animali.

La tubercolosi è una malattia estremamente contagiosa, di conseguenza è necessario effettuare una diagnosi con la massima tempestività. Per la maggioranza dei laboratori è sufficiente l'identificazione del complesso TB, senza individuare la specie coinvolta, poiché la probabilità che il ceppo isolato appartenga ad una specie diversa da *M. tuberculosis* è molto bassa (5, 6, 10). Se si rivelasse necessaria una differenziazione più precisa, è possibile ricorrere ad altri test biochimici in grado di evidenziare le sottospecie del TB complex.

Le metodiche tradizionali di identificazione dei micobatteri si basano sull'evidenziazione di bacilli alcool-acido resistenti mediante colorazione di Ziehl-Nielsen, seguita dalla messa in coltura e dall'analisi biochimica. Ricorrendo a queste tecniche possono occorrere fino a due mesi per l'identificazione di un ceppo (3).

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA impiega meno di un'ora per evidenziare il *M. tuberculosis* complex isolato a partire da una coltura.

PRINCIPIO OPERATIVO

I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena (4). Il metodo AccuProbe impiega una sonda genetica a catena singola associata ad un marker chemiluminescente complementare all'RNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe per formare un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione consente di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro Hologic permette di individuare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore superiore o uguale al valore soglia; negativo se mostrerà un valore inferiore.

REAGENTI

Nota: per informazioni sulle indicazioni di pericolo e i consigli di prudenza che possono essere associati ai reagenti, consultare la libreria delle schede di sicurezza (Safety Data Sheet Library) all'indirizzo www.hologic.com/sds.

I reagenti impiegati nel TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER L'M. TUBERCULOSIS COMPLEX ACCUPROBE

Reagente Sonda (P) <i>Complesso M. tuberculosis.</i>	(4 x 5 provette)
--	------------------

Provette Lisi (LT) <i>Sfere di vetro e tampone.</i>	(1 x 20 provette)
---	-------------------

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCUPROBE

Reagente 1 (Reagente di Lisi) (1) <i>Soluzione tamponata contenente 0,04% di sodio azide.</i>	1 x 10 ml
---	-----------

Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) (2) <i>Soluzione tamponata.</i>	1 x 10 ml
---	-----------

Reagente 3 (Reagente di Selezione) (3) <i>Soluzione tamponata.</i>	1 x 60 ml
--	-----------

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE HOLOGIC

Reagente di Rivelazione I (RI) <i>0,1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0,001 N.</i>	1 x 240 ml
--	------------

Reagente Rivelazione II (RII) <i>Iodossido di sodio 1 N.</i>	1 x 240 ml
--	------------

PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro*.
- B. Durante la realizzazione di questo test adottare le normali precauzioni (1).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione di micobatteri del gruppo TB complex isolati a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. La manipolazione delle colture e tutte le tappe del processo fino alla fase di inattivazione mediante calore devono essere effettuate in un ambiente dotato di livello di sicurezza microbiologica di classe II.
- F. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.

- G. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi o delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II.
ATTENZIONE: PRODOTTO CORROSIVO. In caso di contatto, lavar con acqua. Se si verificassero versamenti, diluirli con acqua prima di asciugare.

CONSERVAZIONE

Le provette di Reagente Sonda devono essere conservate in confezioni di alluminio a temperature comprese fra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere richiusa ermeticamente e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi, entro e non oltre la data di scadenza.

Gli altri reagenti del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA è stato progettato e sviluppato per identificare il *M. tuberculosis* complex isolato a partire da una coltura.

- A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su colture solida adeguata, come un terreno di coltura agar di Löwenstein-Jensen o terreni di coltura di Middlebrook 7H10 o 7H11, quando si osserva una morfologia sospetta per TB complex. Il campione può essere testato sin da quando è visibile la proliferazione e durante i successivi sessanta giorni di incubazione.
1. Il campione di coltura può essere prelevato mediante un'ansa di plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica ovvero un ago in plastica monouso. Data la bassa quantità di liquido in cui i micobatteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non usare tamponi .
 2. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i micobatteri.
 3. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un altro mezzo di coltura per confermare la purezza del campione isolato.
- B. **Identificazione su brodo di coltura.** Il test può essere condotto su colture in brodo di Middlebrook 7H9 con una torbidità superiore o uguale a 1 McFarland. Prelevare con la pipetta un campione da 100 µl della sospensione del brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarlo nella Provetta di Lisi seguendo le istruzioni del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA

bioMérieux cod. 39000 / Hologic Cat. N. 102860/2860

	20 Test
Reagente Sonda (P)	4 x 5 provette
Provetta di Lisi (LT)	1 x 20 provette

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

Anse da 1 µl in plastica sterile, anse metalliche o aghi in plastica per il prelievo delle colonie.

Ceppi di controllo delle colture

Bagnomaria o incubatore (59,5° - 61°C)*

Bagnomaria o incubatore (95° ± 5°C)*

Micropipette (100 µl, 300 µl)

Micropipette a volume fisso (100 µl, 300 µl)

Vortex

Nefelometro 1 McFarland

* Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego di incubatori Hologic.

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminometro Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux cod. 39400</i>)	103100i/3100i
Incubatore (59,5° - 61°C) (<i>bioMérieux cod. 39406</i>)	3397
Incubatore (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux cod. 39407</i>)	3398
Incubatore Twin (59,5°- 61°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux cod. 39408</i>)	3399
Sonicator Hologic (<i>bioMérieux cod. 39409</i>)	901104/T460
Portaprovette per il sonicator Hologic (<i>bioMérieux cod. 39313</i>)	104027/4027
KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCUPROBE (<i>bioMérieux cod. 39305</i>)	102800/2800
KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE HOLOGIC (<i>bioMérieux cod. 39300</i>)	201791/1791

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. Riempire il serbatoio del sonicator con acqua fino a circa 1 cm dal bordo.
2. L'acqua del bagno ad ultrasuoni deve essere perfettamente degassificata prima della manipolazione per ottimizzare il trasferimento energetico degli ultrasuoni. Per degassificare completamente l'acqua far funzionare il sonicator per 15 minuti.
3. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a 59,5° - 61°C e un altro incubatore o sistema a bagnomaria a 95° ± 5°C.

4. Preparare il luminometro Hologic. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per effettuare i test.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio occorre testare sistematicamente ceppi come controllo positivo e negativo, secondo le normative in vigore. È possibile usare una coltura di *M. tuberculosis* (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 25177) come controllo positivo ed una coltura di *M. avium* (ATCC 25291) come controllo negativo.

C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Predisporre un numero sufficiente di Provette di Lisi per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
2. Trasportare tramite pipetta 100 µl di Reagente 1 (Reagente di Lisi) e 100 µl di Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) in tutte le Provette di Lisi. **Se il test viene eseguito su ceppi isolati a partire da brodo di coltura, non aggiungere Reagente 1 nelle Provette di Lisi.**
3. Trasportare il campione proveniente dal terreno di coltura solido o 100 µl del brodo di coltura correttamente omogeneizzato nelle Provette di Lisi, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Se il test viene eseguito su una coltura solida, vortexare l'ansa o l'ago nella soluzione per rimettere le cellule in sospensione.
4. Richiudere le provette di lisi e vortexarle brevemente.

D. LISI DEL CAMPIONE

1. Inserire le Provette di Lisi nel portaprovette del sonicatore affinché venga sommersa la miscela di reagente presente sul fondo, mantenendo i tappi fuori dall'acqua. Posizionare il portaprovette. **IN NESSUN CASO LE PROVETTE DEVONO TOCCARE IL FONDO O LE PARETI DEL SONICATORE.**
2. Fare funzionare il sonicatore per 15 minuti.
3. Inserire successivamente le provette che contengono i microrganismi lisati mediante sonicazione nell'incubatore o a bagnomaria a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti.
4. Togliere con la massima prudenza le Provette di Lisi dall'incubatore o dal bagnomaria.

E. IBRIDAZIONE

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni di alluminio. Prelevare il numero necessario di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare la confezione di agenti essiccanti.**
2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Prelevare 100 µl di campione lisato dalle Provette di Lisi e dispensarli nelle rispettive provette di Reagente Sonda.
4. Richiudere le provette di Reagente Sonda e metterle ad incubare per 15 minuti a $59,5^{\circ} - 61^{\circ}\text{C}$ (7) a bagnomaria o in incubatore.

F. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 µl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette vortexarle per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per 10 minuti a 59,5° - 61°C a bagnomaria o in incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Togliere e buttare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro leggere i risultati del test nell'ora successiva.**

G. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugarle utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire attentamente le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a 35° - 60°C e vortexarlo per sciogliere il precipitato.
 - B. TEMPERATURA: l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.
 - C. DURATA DELLE OPERAZIONI: le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare come minimo 15 minuti e come massimo 20 minuti. Durante la SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione almeno per 10 minuti senza superare però il limite degli 11 minuti.
 - D. BAGNOMARIA: il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che le provette di lisi siano immerse fino all'anello di chiusura, ma non oltre. Assicurarsi inoltre che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente immerso.
 - E. USO DEL VORTEX: è fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la PREPARAZIONE del CAMPIONE e la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'inoculazione dei microrganismi ai Reagenti 1 e 2 e dopo l'aggiunta del Reagente 3.
- ## F. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI
1. Alti valori di controllo negativo (*M. avium*, ATCC 25291), superiori a 10.000 RLU (Relative Light Units) sul luminometro Leader o a 300 PLU (Photometric Light Units) sul luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'inoculazione del Reagente 3 (Reagente di Selezione) o quando siamo in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.
 2. Bassi valori di controllo positivo (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), inferiori a 30.000 RLU sul luminometro Leader o a 900 PLU sul luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente, quando la sonicazione non è stata correttamente eseguita o quando il test viene effettuato su colture miste o invecchiate. Per

verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA vengono interpretati in base ad un valore soglia. I campioni che generano un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona nell'area di incertezza, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi fa nuovamente emergere risultati equivoci, occorre trapiantare il ceppo per verificarne la purezza.

	AccuLDR (precedentemente PAL)	Leader
Valore limite	900 PLU	30.000 RLU
Area di incertezza	600 - 899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ E ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *M. avium*, ATCC 25291) e positivi (ad es. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) devono soddisfare i seguenti valori:

	AccuLDR (precedentemente PAL)	Leader
Controllo negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Controllo positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

LIMITI DEL TEST

Questo metodo è stato testato su colture fresche realizzate in terreni di coltura solidi e sui tipi di brodo di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test eseguito direttamente su campioni clinici (urinari, coprologici o respiratori) non sono state valutate.

Il test non permette di differenziare le sottospecie del complesso TB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, e *M. canetti*).

I risultati del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati del laboratorio e correlati ai dati clinici.

VALORI ATTESI

IL TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di colture con identificazione biochimica su due centri. Sono stati testati 612 stock-colture del complesso TB, 748 stock-colture di altre 28 specie di micobatteri e altri 7 ceppi provenienti da un genere diverso. Le metodiche tradizionali di identificazione comprendevano lo studio del tasso di accrescimento, l'analisi della morfologia delle colonie, l'esame microscopico e una serie di test biochimici. Il test AccuProbe ha permesso di classificare le colture positive (≥ 30.000 RLU) e negative (< 30.000 RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi fra 226 e 33.343 RLU mentre le colture positive hanno mostrato

risultati compresi fra 4.163 e 646.053 RLU. Il confronto di questi risultati con le metodiche tradizionali di identificazione è di seguito indicato.

AccuProbe / COLTURA						
AccuProbe Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	422	1	1	541	99,8%/99,1%	99,8%
Centro 2	185	0	4	213	98,9%/100%	99,0%
Totale	607	1	5	754	99,2%/99,9%	99,6%

I campioni discordanti sono stati nuovamente testati e hanno evidenziato i risultati attesi, fatta eccezione per un ceppo del centro 2 che non era vitale.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA è stata calcolata analizzando due diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *M. tuberculosis* per 10 volte in una medesima serie.

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	51.939	126.563
Deviazione standard	1.980	5.869
Coefficiente di variazione	3,8%	4,6%

B. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica due diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *M. tuberculosis* in 12 serie differenti.

Campione	A	B
Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	51.522	126.227
Deviazione standard	1.952	4.575
Coefficiente di variazione	3,8%	3,6%

C. SPECIFICITÀ

È stato studiato un totale di 94 colture ATCC tramite il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA. Questi ceppi comprendevano 92 specie provenienti da 40 generi diversi. È stato testato un pannello filogenetico di 6 ceppi del TB complex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. tuberculosis*), 25 ceppi di altre 25 specie di micobatteri e 63 ceppi di altri 39 generi. Unicamente i ceppi del TB complex hanno presentato un risultato positivo con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA. Le altre specie di micobatteri e gli altri microrganismi hanno evidenziato un risultato negativo.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Diluizioni di RNA ribosomiale di *M. tuberculosis* le cui concentrazioni erano comprese fra 5×10^{-4} µg e 1×10^{-1} µg per test sono state analizzate in presenza di 30 milioni di microrganismi appartenenti a una delle seguenti specie: *M. avium*, *M. kansasii* o *Nocardia asteroides*. Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione incrociata con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA.

TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA

(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat.No. 102860/2860)

UTILIZAÇÃO

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN das micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (complexo TB) isolado a partir de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização de ácidos nucleicos. O complexo TB é composto pelas seguintes espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti* (8, 11).

INTRODUÇÃO

Os microorganismos do complexo TB dão origem a uma morbidez e a uma mortalidade significativa no homem. *M. tuberculosis* é o germe patogénico do complexo TB mais frequentemente isolado no homem. Em 1988 foram detectados 21.244 novos casos de tuberculose nos EUA (2). *M. bovis BCG* pode ser transmitido ao homem a partir de animais infectados (6). *M. africanum* é responsável pela tuberculose pulmonar na África Tropical (9), e *M. microti* infecta essencialmente os animais.

A tuberculose é uma doença altamente contagiosa, por isso, é importante estabelecer rapidamente o diagnóstico. Para a maioria dos laboratórios, a identificação do complexo TB sem determinação da espécie implicada é suficiente, visto que a probabilidade de a estirpe isolada pertencer a uma outra espécie que não o *M. tuberculosis* é extremamente pequena (5, 6, 10). Uma série de testes bioquímicos permitem identificar, em seguida, as sub-espécies do complexo TB, se for necessária uma diferenciação mais precisa.

Os métodos clássicos de identificação das micobactérias baseiam-se na detecção dos bacilos ácido-álcool-resistentes por coloração de Ziehl-Nielsen, seguida de cultura e análise bioquímica. Podem ser necessários dois meses para identificar uma estirpe com estes métodos (3).

O teste ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA identifica o complexo *M. tuberculosis* isolado a partir de uma cultura em menos de uma hora.

PRINCÍPIO

Os testes por hibridização de ácidos nucleicos baseiam-se na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucleicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicatenários estáveis (4). O método AccuProbe utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar do ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Quando o ARN do organismo alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN-ARN estável. O Reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não-hibridizadas. O luminómetro Hologic permite medir o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar; é negativo se indicar um valor inferior.

REAGENTES

Nota: Para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em www.hologic.com/sds.

Os reagentes utilizados para o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA são fornecidos em três kits distintos:

KIT SONDA PARA O COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ACCUPROBE

Reagente Sonda (P) <i>Complexo M. tuberculosis.</i>	(4 x 5 tubos)
---	---------------

Tubo de Lise (LT) <i>Esferas de vidro e tampão.</i>	(1 x 20 tubos)
---	----------------

KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA ACCUPROBE

Reagente 1 (Reagente de Lise) (1) <i>Solução tampão contendo 0,04% de azida sódica.</i>	1 x 10 ml
---	-----------

Reagente 2 (Tampão de Hibridização) (2) <i>Solução tampão.</i>	1 x 10 ml
--	-----------

Reagente 3 (Reagente de Selecção) (3) <i>Solução tampão.</i>	1 x 60 ml
--	-----------

KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO HOLOGIC

Reagente de Detecção I (RI) <i>0,1% de peróxido de hidrogénio em ácido nítrico 0,001 N.</i>	1 x 240 ml
---	------------

Reagente de Detecção II (RII) <i>Hidróxido de sódio 1 N.</i>	1 x 240 ml
--	------------

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- A. Unicamente para diagnóstico in vitro.
- B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (1).
- C. Utilizar unicamente para a identificação de micobactérias do complexo TB isoladas a partir de uma cultura.
- D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de utilização única.
- E. A manipulação das culturas e todas as etapas do procedimento até à etapa de inactivação pelo calor devem ser efectuadas num local de segurança microbiológica de classe II.
- F. Os reagentes deste kit contêm azida sódica susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminar estes reagentes, é aconselhável diluir com bastante água para prevenir a formação de azidas na canalização.

- G. Evitar qualquer contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele os olhos e as mucosas.
ATENÇÃO: PRODUTO CORROSIVO. Em caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.

CONSERVAÇÃO

Os tubos de Reagente Sonda devem ser conservados nas saquetas de alumínio a 2° - 8°C. Antes da abertura permanecem estáveis até à data de validade indicada. Depois da abertura, a saqueta deve ser fechada hermeticamente e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA podem ser conservados entre 2° e 25°C, e permanecem estáveis até à data de validade.

NÃO CONGELAR OS REAGENTES.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA é concebido para identificar o complexo *M. tuberculosis* isolado a partir de uma cultura.

- A. **Identificação a partir de cultura em meio sólido.** O teste pode ser efectuado com culturas realizadas num meio sólido apropriado, como uma gelose inclinada de Löwenstein-Jensen, ou em meios de Middlebrook 7H10 ou 7H11, quando se observa uma morfologia que evoca o complexo TB. A amostra pode ser analisada logo que a proliferação seja visível e durante os 60 dias de incubação seguintes.
1. A amostra de cultura pode ser colhida com uma ansa de plástico descartável de 1 µl, com uma ansa metálica ou com uma agulha de plástico descartável. Não utilizar zaragatoa visto que as micobactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade de líquido mínima.
 2. Evitar colher parte do meio sólido de cultura.
 3. O bacteriologista pode, nesta etapa, decidir semear um outro meio de cultura para confirmar a pureza da amostra isolada.
- B. **Identificação a partir de caldo de cultura.** O teste pode ser efectuado com culturas em caldo de Middlebrook 7H9 que possuam uma turbidez superior ou igual a 1 McFarland. Colher com a pipeta uma amostra de 100 ml da suspensão do caldo correctamente homogeneizado, e distribuí-la no Tubo de Lise, seguindo as instruções do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

MATERIAL FORNECIDO

TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA

(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860/2860)

	20 Testes
Reagente Sonda (P)	4 x 5 tubos
Tubo de Lise (LT)	1 x 20 tubos

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas ou agulhas de plástico para colher as colónias
Estirpes de controlo das culturas
Banho-maria ou bloco de aquecimento (59,5° - 61°C)*
Banho-maria ou bloco de aquecimento (95° ± 5°C)*
Micropipetas (100 µl, 300 µl)
Pipetas de repetição (100 µl, 300 µl)
Vortex
Padrão de nefelometria McFarland 1

* Os orifícios do bloco de aquecimento devem estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Aconselha-se a utilização dos blocos de aquecimento Hologic.

EQUIPAMENTO SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminómetro Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i/3100i
Bloco de aquecimento (59,5° - 61°C) (<i>bioMérieux ref. 39406</i>)	3397
Bloco de aquecimento (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39407</i>)	3398
Bloco de aquecimento Twin (59,5°- 61°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39408</i>)	3399
Sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104/T460
Suporte de tubos para o sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027/4027
KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS ACCUPROBE (<i>bioMérieux ref. 39305</i>)	102800/2800
KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO HOLOGIC (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791/1791

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Encher o reservatório do sonicador com água até cerca de 1 cm do bordo.
2. A água do banho de ultrasons deve estar perfeitamente desgaseificada antes da manipulação, para otimizar a transferência de energia dos ultrasons. Para desgaseificar completamente a água, colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
3. Regular um bloco de aquecimento ou um banho-maria a 59,5° - 61°C e um outro a 95° ± 5°C.
4. Preparar o luminómetro Hologic. Assegurar-se de que a quantidade de reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar os testes.

B. CONTROLOS

As estirpes de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma cultura de *M. tuberculosis* (por ex. American Type Culture Collection, ATCC 25177) como controlo positivo, e uma cultura de *M. avium* (ATCC 25291) como controlo negativo.

C. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

1. Identificar um número suficiente de Tubos de Lise para analisar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Tirar e conservar as tampas.
2. Transferir com a pipeta 100 µl de Reagente 1 (Reagente de Lise) e 100 µl de Reagente 2 (Tampão de Hibridização) para todos os tubos de Lise. **Se o teste for efectuado com estirpes isoladas a partir de caldo de cultura, não adicionar Reagente 1 aos Tubos de Lise.**
3. Transferir a amostra proveniente do meio sólido ou 100 µl do caldo de cultura correctamente homogeneizado para os Tubos de Lise, seguindo as instruções descritas no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou agulha na solução para colocar as células em suspensão.
4. Fechar os tubos de lise e agitá-los rapidamente num Vortex.

D. LISE DA AMOSTRA

1. Inserir os Tubos de Lise no suporte do sonicador de forma a que a mistura de reagente no fundo dos tubos fique imersa, mantendo as tampas fora de água. Colocar o suporte no local. OS TUBOS NÃO DEVEM, EM CASO ALGUM, TOCAR NO FUNDO OU NAS PAREDES DO SONICADOR.
2. Colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
3. Em seguida, colocar os tubos que contêm os microorganismos lisados por sonicação no bloco de aquecimento ou banho-maria a $95^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$ durante 10 minutos.
4. Retirar cuidadosamente os Tubos de Lise do bloco de aquecimento ou do banho-maria.

E. HIBRIDIZAÇÃO

1. Cortar horizontalmente a parte superior das saquetas de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Fechar a saqueta hermeticamente dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com uma pinça. **Não retirar a saqueta que contém o dissecante.**
2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Retirar 100 µl de amostra lisada dos Tubos de Lise e distribuí-los nos tubos de Reagente Sonda correspondentes.
4. Fechar os tubos de Reagente Sonda e colocá-los a incubar durante 15 minutos a $59,5^{\circ} - 61^{\circ} \text{C}$ (7) em banho-maria ou bloco de aquecimento.

F. SELECÇÃO

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Distribuir 300 µl de Reagente 3 (Reagente de Selecção) em cada tubo. Voltar a tapar os tubos e agitá-los num Vortex para obter uma mistura homogénea.

2. Incubar os tubos de Reagente Sonda durante 10 minutos a 59,5° - 61°C em banho-maria ou bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. **Ler os resultados no luminómetro durante a hora seguinte.**

G. DETECÇÃO

1. Seleccionar o protocolo apropriado no luminómetro.
2. Para retirar resíduos da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Em seguida, colocá-los no luminómetro e seguir as instruções.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.

NOTAS

- A. REAGENTES: o Reagente 2 (Tampão de Hibridização) pode precipitar. Aquecê-lo a 35° - 60°C e agitá-lo para dissolver o precipitado.
- B. TEMPERATURA: a hibridização e a selecção são reacções termo-dependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.
- C. DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES: as reacções de hibridização e de selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 10 minutos, mas não mais de 11 minutos.
- D. BANHO-MARIA: a água deve estar ao nível do anel de fecho dos tubos de Lise, não acima. Certificar-se de que a totalidade do líquido reaccional dos tubos de Reagente Sonda está bem imersa.
- E. UTILIZAÇÃO DO VORTEX: é essencial dispor de uma mistura homogénea durante as etapas de PREPARAÇÃO da AMOSTRA e de SELECÇÃO, especialmente após a adição dos microorganismos aos Reagentes 1 e 2, e após a adição do Reagente 3.
- F. RESOLUÇÃO DE INCIDENTES
 1. Podem observar-se valores elevados de controlo negativo (*M. avium*, ATCC 25291), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units) no luminómetro Leader ou a 300 PLU (Photometric Light Units) no luminómetro AccuLDR (anteriormente PAL) se a homogeneização tiver sido insuficiente depois da adição do Reagente 3 (Reagente de Selecção), ou se estiverem presentes diversos tipos de colónias. Para verificar se se trata de uma cultura mista, pode ser repicada uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
 2. Podem observar-se valores fracos de controlo positivo (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), inferiores a 30.000 RLU no luminómetro Leader ou a 900 PLU no luminómetro AccuLDR (anteriormente PAL) se o número de germes for insuficiente, se a sonicação não tiver sido correctamente efectuada ou se o teste tiver sido efectuado com culturas mistas ou antigas. Para verificar se se trata de uma cultura mista, pode ser repicada uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.

RESULTADOS

A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar na zona duvidosa, o teste deve ser repetido. Se a segunda análise der também um resultado equívoco, é necessário repicar a estirpe para verificar a sua pureza.

	AccuLDR (anteriormente PAL)	Leader
Valor limite	900 PLU	30.000 RLU
Zona duvidosa	600 - 899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controlos negativos (por ex. *M. avium*, ATCC 25291) e positivos (por ex. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) devem encontrar-se nos seguintes valores:

	AccuLDR (anteriormente PAL)	Leader
Controlo negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Controlo positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

LIMITES DO TESTE

Este método foi testado com culturas frescas efectuadas em meios sólidos e com os tipos de caldos de cultura citados no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. As performances deste teste, praticado directamente com amostras clínicas (urinárias, coprológicas ou respiratórias) não foram avaliadas.

O teste não permite diferenciar as sub-espécies do complexo TB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, e *M. canetti*).

Os resultados do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA devem ser interpretados em função de outros dados de laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

VALORES ESPERADOS

O teste ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA foi comparado com os métodos clássicos de cultura com identificação bioquímica em dois locais. Foram testadas 612 estirpes de complexo TB, 748 estirpes de 28 outras espécies de micobactérias e 7 outras estirpes provenientes de um género diferente. Os métodos clássicos de identificação compreendiam o estudo da taxa de crescimento, o estudo da morfologia das colónias, o exame microscópico e uma série de testes bioquímicos. O teste AccuProbe permitiu classificar as estirpes em positivas (≥ 30.000 RLU) e negativas (< 30.000 RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 226 e 33.343 RLU, as culturas positivas deram resultados compreendidos entre 4.163 e 646.053 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação, é descrita abaixo.

AccuProbe / CULTURA						
AccuProbe Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade Especificidade	Taxa de Concordância
Local 1	422	1	1	541	99,8%/99,1%	99,8%
Local 2	185	0	4	213	98,9%/100%	99,0%
Total	607	1	5	754	99,2%/99,9%	99,6%

As amostras discordantes foram novamente analisadas e deram resultados esperados, exceptuando uma estirpe do local 2 que não era viável.

PERFORMANCE DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA foi calculada testando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *M. tuberculosis*, 10 vezes numa mesma série.

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	51.939	126.563
Desvio-padrão	1.980	5.869
Coefficiente de variação	3,8%	4,6%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

A precisão inter-ensaio foi calculada testando, singularmente, duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *M. tuberculosis*, em 12 série distintas.

Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	51.522	126.227
Desvio-padrão	1.952	4.575
Coefficiente de variação	3,8%	3,6%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 94 estirpes de culturas ATCC com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA. Estas estirpes compreendiam 92 espécies de 40 géneros diferentes. Foi analisado um painel filogenético de 6 estirpes do complexo TB (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. tuberculosis*), 25 estirpes de 25 outras espécies de micobactérias e 63 estirpes de 39 outros géneros. Unicamente as estirpes do complexo TB deram um resultado positivo com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA. As outras espécies e os outros microorganismos deram um resultado negativo.

D. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas diluições de ARN ribossómico de *M. tuberculosis* cujas concentrações estavam compreendidas entre $5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ e $1 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ por teste, na presença de 30 milhões de microorganismos pertencentes a uma das seguintes espécies: *M. avium*, *M. kansasii* ou *Nocardia asteroides*. Não foi observada nenhuma interferência nem reacção cruzada com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS ISOLADAS DE UMA CULTURA.

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA

1. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. 37: 377-382, 387-388.
2. **Centers for Disease Control.** 1989. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. 37: 805.
3. **Kent, P.T., and G. P. Kubica.** 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta.
4. **Kohne, D. E., A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus legionella, p. 107-108. *In* C. Thornsberry, et al. (ed.), Legionella: proceedings of the 2nd international symposium. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
5. **Runyon, E. H., A. G. Karlson, G. P. Kubica, and L. G. Wayne.** 1980. *Mycobacterium*, p. 150-179. *In* E. H. Lennette et al (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
6. **Sommers, H. M., and R. C. Good.** 1985. *Mycobacterium*, p. 216-248. *In* E. H. Lennette et al (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. **Somaskövi, A., J.E. Hotaling, M. Fitzgerald, V. Jonas, D. Stasik, L.M. Parsons, and M. Salfinger.** 2000. False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe Mycobacterium tuberculosis complex assay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2743-2745.
8. **Wayne, L.G.** 1982. Microbiology of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 12 (Suppl): 31-41.
9. **Youmans, G.P.** 1979. Introduction: tuberculosis in the world today, p. 1-7. *in* Tuberculosis, W. B. Saunders, Philadelphia.
10. **Williams and Wilkins, Baltimore.** 1977. Mycobacteriaceae, p. 255-26. *In* J. G. Holt (ed.), The shorter bergey's manual of determinative bacteriology.
11. **Van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P.E.W. DeHaas, P.W. Hermans, M.A. Koedam, K.S. Teppema, P.J. Brennan, G.S. Besra, F. Portaels, J. Top, L.M. Schouls, and J.D.A. Van Embden.** 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. System Bacteriol* 47: 1236-1245.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 (USA)



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium



This product may be covered by one or more U.S. patents identified at www.hologic.com/patents.

102896F-01 Rev. 003 2018-03
©1990 - 2018 Hologic, Inc. All rights reserved.